

PARTIAL TRANSLATION OF WO 02/060472 (Ref.2)

Title of the invention: REMEDIES FOR HYPONUTRITION STATUS

Application No.: PCT/JP02/00765

Filing date: January 31, 2002

Applicant: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKIKAISHA

(Claims)

1. A remedy for disease with hyponutrition status, which contains ghrelin or ghrelin analog as an active ingredient.
2. The remedy according to claim 1, wherein the disease with hyponutrition status is selected from cachexia, malignant disease and prostration caused by weight loss in association with infection or inflammatory disease.
3. The remedy according to claim 2 for anorexia or weight reduction in association with cachexia.
4. The remedy according to claims 1-3 for peripheral administration.
5. A method for screening an agonist or antagonist of ghrelin or ghrelin analog, wherein the method comprises administering a candidate substance to an animal, and then determining level of expression of mRNA, bonding amount of NPY and Y1 receptor of NPY, oxygen consumption, gastric emptying rate, or activity of vagus nerve.
6. A remedy for anorexia or weight reduction, which as the active ingredient contains an agonist or antagonist of ghrelin or ghrelin analog obtained by a method according to claim 4.
7. An agent for preventing or treating for obesity, which contains as the active ingredient an agonist or antagonist of ghrelin or ghrelin analog obtained by a method according to claim 4.

CB

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002年8月8日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/060472 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 38/18, 45/00, A61P 1/14, 3/04, 43/00, G01N 33/50, 33/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/00765
- (22) 国際出願日: 2002年1月31日 (31.01.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2001-24423 2001年1月31日 (31.01.2001) JP
- (74) 代理人: 社本 一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 乾 明夫 (INUI, Akio) [JP/JP]; 〒654-0153 兵庫県神戸市須磨区南落合1-20-4 Hyogo (JP). 浅川 明弘 (ASAKAWA, Akihiko) [JP/JP]; 〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町6-12-20-1101 Hyogo (JP). 加賀 敏宏 (KAGA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒659-0096 兵庫県芦屋市山手町17-6 Hyogo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR HYPONUTRITION STATUS

(54) 発明の名称: 低栄養症状疾患治療剤

(57) Abstract: Remedies for diseases with hypnutrition status such as inappetence, cachexia or malignant diseases and prostration caused by weight loss in association with infection or inflammatory diseases. These remedies contain as the active ingredient ghrelin or its analogs.

(57) 要約:

本発明は、食欲不振、悪液質又は悪性疾患、感染症及び炎症性疾患による付随的体重減少による衰弱状態などの低栄養症状を示す疾患の治療剤を提供するものであり、グレリン又はグレリン類似体を有効成分として含有する低栄養症状を示す疾患の治療剤に関する。

WO 02/060472 A1

明細書
低栄養症状疾患治療剤

技術分野

- 5 本発明は新規な低栄養症状疾患治療剤に関する。さらに詳しくは、グレリン又はグレリン類似体を有効成分として含有する低栄養症状を示す疾患の治療剤に関する。また、グレリンのアゴニスト又はアンタゴニストを用いた新規な摂食異常又は代謝異常治療剤に関する。

10 背景技術

- 体重調節は摂食量とエネルギー消費のバランスが鍵を握り、両者のバランスが肥満、やせを引き起こす。1994年に発見されたレプチンが adiposity (体脂肪量蓄積) シグナルとして体重調節の根幹に関わることが明らかにされて以来、レプチンの下流に位置する、多くの新しい食欲調節に関与するペプチドが見いだされた。特に、それまで個々独立した機能としてしか捉えられていなかった視床下部由来の神経ペプチド群が、レプチンの下流でそれぞれが機能し、さらにこれらの神経ペプチド群相互間でも密に情報交換が行われていることがわかってきた。

- これらの神経ペプチドのうち、食欲を亢進する物質としては、ニューロペプチド Y (NPY)、オレキシン類 (orexins)、モチリン (motilin)、メラニン濃縮ホルモン (melanin-concentrating hormone : MCH) やアゴウチ関連タンパク質 (agouti-related protein : AGRP) が知られている。また、食欲を抑制する物質としては、 α -メラノサイト刺激ホルモン (α -melanocyte-stimulating hormone : α -MSH)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin-releasing factor : CRF)、コカイン-及びアンフェタミン-制御転写物 (cocain- and amphetamine- regulated transcript : CART) やコレシストキニン (cholecystokinin : CCK) などが知られている。これらのペプチドは胃腸の運動を制御する生理学的メカニズムに関与しており、エネルギー恒常性に影響すると考えられている。

特に、NPYは36アミノ酸からなる神経伝達物質であり、摂食中枢とされる

視床下部に豊富に発現する。NPYは視床下部弓状核（ARC）で産生され、軸索を通じて主に室傍核（PVN）へと分泌されて摂食に影響を及ぼす。NPYを中枢投与すると強力な摂食亢進作用を示す（Schwartz, MW et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 69:584, 1999）が、末梢への投与では摂食に関係しないか、逆に抑制傾向を示した。この現象は他のPPファミリーペプチドでも同様に見られる。NPYが引き起こす種々の生理作用はNPY受容体を介して行われる。NPY受容体は現在、5つのサブタイプ（Y1、Y2、Y4、Y5、y6）がクローニングされており、その基本構造は7回膜貫通型Gタンパク質共役受容体である。リガンドの結合特異性と摂食促進活性の検討からY5受容体が、そしてアンタゴニスト投与実験を含めた解析から、Y1受容体が摂食調節と密接に関係する受容体として報告されている（Inui A., *Trends Pharmacol Sic* 20:43-46, 1999 など）。

一方、成長ホルモン（GH）は、下垂体前葉から分泌されるホルモンであり、その分泌は巧妙に制御されており、視床下部の成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）によって刺激を受け、ソマトスタチンによって抑制される。近年、GHRHやソマトスタチンとは別の経路によるGH分泌調節機構が明らかになってきた。この別経路のGH分泌調節機構は、GHの分泌促進活性をもつ合成化合物である成長ホルモン放出促進因子（growth hormone secretagogue : GHS）の研究により展開されてきた。GHSはGHRHとは異なる経路で作用する。すなわち、GHRHはGHRH受容体を活性化して、細胞内cAMP濃度を上昇させるのに対して、GHSはGHRH受容体とは異なる受容体を活性化して、細胞内IP3系を介して細胞内Ca⁺⁺イオン濃度を上昇させる。このGHSが作用する受容体であるGHS-Rは、1996年に発現クローニング法により構造が解明された（Howard A.D. et al, *Science*, 273: 974-977, 1996）。GHS-Rは細胞膜を7回貫通する典型的なGタンパク質共役型受容体であり、主として視床下部、下垂体に存在する。

さらに、生体内に存在しない合成化合物であるGHSを結合する受容体が存在することから、このGHS-Rに結合して、活性化する内因性のリガンドが探索された。その結果、GHS-Rに特異的なリガンドとして、グレリン（Ghrelin）がラットの胃から精製、同定された（Kojima M. et al., *Nature*, 402:656-660,

YとY1受容体を介して顕著な食欲促進作用を示すことを発見し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、グレリンを有効成分として含有する低栄養症状を示す疾患の治療剤を提供する。

- 5 本発明はさらに、グレリンの存在下又は非存在下に、候補物質を動物に投与し、摂食量、NPY mRNA発現量、NPYとNPYのY1受容体との結合量、酸素消費量、胃内容排出速度、又は迷走神経の活性を測定することを含む、グレリンのアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

- 10 本発明はさらに、上記方法により得られるグレリンのアゴニストを有効成分として含有する食欲不振症又は体重減少症治療剤を提供する。

本発明はさらに、上記方法により得られるグレリンのアンタゴニストを有効成分として含有する肥満予防剤又は治療剤を提供する。

図面の簡単な説明

- 15 図1は、Aは、ヒトグレリンとヒトモチリンのアミノ酸配列を示したものである。Bは、ヒトグレリン受容体とヒトモチリン受容体のアミノ酸配列を示したものである。同じアミノ酸を星印で示す。

図2は、グレリンICV投与の摂食に及ぼす効果を示す。

- 20 図3は、NPY、AGRP、オレキシンA、オレキシンB及びMCHと比較したグレリンのマウスICV投与の効果を示す。

図4は、グレリンのICV投与後の視床下部におけるNPY遺伝子の発現を示す。上のパネルは、グレリンICV投与後の視床下部NPY mRNAのノーザンブロットを示す。下のグラフは、ノーザンブロットのデータをG3PDH mRNAに正規化して対照群のパーセントで表示したものである。

- 25 図5は、NPYのY1受容体アンタゴニスト(BIBO3304)及びY5受容体アンタゴニスト(L152804)で前処理することが、グレリンで誘導された摂食に及ぼす効果を示す。

図6は、グレリンICV投与の酸素消費量に及ぼす効果を示す。

図7は、グレリンIP投与の摂食に及ぼす効果を示す。

図 8 は、グレリン I P 投与の視床下部 NPY mRNA 発現に及ぼす効果を示す。

図 9 は、グレリン I P 投与の胃内容排出速度に及ぼす効果を示す。

図 10 は、迷走神経切断術がグレリンの摂食促進効果に及ぼす効果を示す。

- 5 図 11 は、迷走神経切断術がグレリン投与時の胃迷走神経の求心性神経活性に及ぼす効果を示す。

図 12 は、48 時間絶食したリーンマウスにおける、グレリン mRNA の胃での発現をノーザンブロット分析で試験した結果を示す。

- 10 図 13 は、IL-1 β 及びレプチンを I P 投与したときの、胃におけるグレリン mRNA 発現をノーザンブロットで試験した結果を示す。

図 14 は、ob/ob 肥満マウスの胃におけるグレリン mRNA 発現をノーザンブロットで試験した結果を示す。

図 15 は、ob/ob マウスにレプチンを繰り返し投与したときの、胃におけるグレリン mRNA 発現をノーザンブロットで試験した結果を示す。

- 15 図 16 は、絶食リーンマウスにグレリンと IL-1 β を共投与したときの摂食量と体重に及ぼす効果を示す。

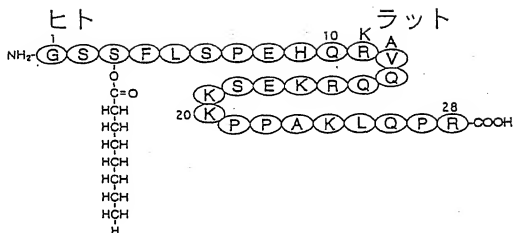
図 17 は、グレリンを繰り返し投与したときの、IL-1 β で誘導される摂食量と体重の減少に及ぼす効果を示す。

- 20 図 18 は、LC-6 移植 HHM/cahexia モデルマウスにおけるグレリンの体重増加に及ぼす効果を示す。

図 19 は、LC-6 移植 HHM/cahexia モデルマウスにおけるグレリンの脂肪増加に及ぼす効果を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 25 本発明で有効成分として用いるグレリンは、式 1 で表されるラットグレリン又はヒトグレリン又はグレリン類似体である。



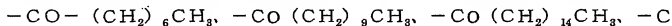
グレリン類似体には、食欲促進作用を有する限り、28個のアミノ酸の1個以上のアミノ酸が欠損、置換または付加されているものも包含され、さらに、これらの各種誘導体、例えば、ペプチド構成アミノ酸が置換された誘導体（アミノ酸間に基、例えば、アルキレンが挿入されたものも包含する）及びエステル誘導体も包含される。

グレリン又はグレリン類似体はいかなる方法で製造したものでもよく、例えば、ヒト、ラットの細胞より分離、精製したもの、合成品、半合成品、遺伝子工学的手法により得られたものなどを含み、特に制限はない。

28個のアミノ酸の1個以上のアミノ酸が欠損、置換または付加されているものの例としては、グレリンの14番目のG1n残基が欠除した、des-Gln14-グレリンなどが代表的である。ラット des-Gln14-グレリンはグレリン遺伝子のスプライシングの違いにより生じるものであり、ラット胃においてはグレリンの4分の1程度存在し、成長ホルモン放出活性の強さはグレリンと同じである。

さらに、J.Med.Chem.2000, 43, 4370-4376 には、ヒトGHSR1aの活性化に必要なグレリンの最少配列が記載されており、ここに記載された下記のようなものも本発明のグレリン類似体に包含される。例えば、グレリン28個のアミノ酸のうち、N末端から3及び4番目のアミノ酸（好ましくは、N末端4個のアミノ酸）を有し、かつN末端から3番目のアミノ酸（Ser）の側鎖が置換されているペプチド及びその誘導体であって、食欲促進作用を有するものが挙げられる。

N末端から3番目のアミノ酸の側鎖の例としてはグレリンの側鎖であるn-オクタノイル以外のアシル基及び置換アルキル基（これらの炭素数は6～18が好ましい）が挙げられ、具体的な側鎖としては、下記のものが挙げられる：



$O-CH=CH-CH=CH-CH=CH-CH_3$, $-CO-CH(CH_2CH_2CH_3)_2$, $-CO-(CH_2)_6CH_2Br$, $-CO-(CH_2)_2CONH(CH_2)_2CH_3$, $-CH_2-NH-CO(CH_2)_8CH_3$, $-CH_2-O-CO(CH_2)_8CH_3$, $-CH_2-NH-CO(CH_2)_6CH_3$,

5



- N末端から3及び4番目のアミノ酸を有し、かつN末端から3番目のアミノ酸 (Ser) の側鎖が置換されているグレリン類似体の具体的な例としては、第3
 10 7回ペプチド討論会(2000年10月18日~20日)で報告された化合物:
 $NH_2-(CH_2)_4-CO-Ser(オクチル)-Phe-Leu-NH-(CH_2)_2-NH_2$ があげられる。

本発明によって明らかになった以下に記載するグレリンの作用メカニズムを考慮すると、これらのグレリン類似体も食欲促進活性を期待することができる。

- 15 本発明の低栄養症状を示す疾患の治療剤においては、グレリン又はグレリン類似体を2種以上組み合わせて用いてもよい。

- 本発明の低栄養症状を示す疾患の治療剤は中枢投与(例えば脳室内投与、脊髓腔注)とすることも、末梢投与とすることも可能である。好ましくは、末梢投与で使用する。上述したように、NPYや他のPPファミリーペプチドは末梢への
 20 投与では摂食に関係しないが、本発明の治療剤は末梢投与でも顕著な食欲亢進効果を示した。従って、本発明の治療剤は投与に伴う患者の苦痛が少なく、かつ簡単に服用することができ、従来の食欲調節性ペプチドに比べてはるかに利点が大
 きい。

- グレリン又はグレリン類似体は、公知の製剤技術により、単独あるいは薬理
 25 学的に受容しうる担体、添加剤などとともに、通常の経口投与用製剤及び非経口投与用製剤とすることができる。例えば、溶液製剤(動脈注、静脈注又は皮下注などの注射剤、点鼻剤、シロップ剤等)、錠剤、トロース剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏剤、座剤などに製剤化することができる。また、ドラッグデリバリーシステム(除放剤など)で使用することも可能である。

本発明の低栄養症状を示す疾患の治療剤の投与量は、患者の年齢、体重、症状、投与経路などに応じて異なり、医師の判断によって決定される。通常、静脈内投与のためには、グレリンとして、体重1kgあたり約0.1 μ g \sim 1000mg、好ましくは約0.01mg \sim 100mg、より好ましくは0.1mg \sim 10mgである。但し、投与量はこれに限定されるものではない。

本発明の治療剤は、低栄養症状を示す疾患の治療に用いることができ、特に食欲不振、悪液質又は悪性疾患、感染症及び炎症性疾患による付随的体重減少による衰弱状態から選ばれる疾患に有効である。とりわけ、悪液質に伴う食欲不振症又は体重減少症の治療剤として有用である。悪液質は、漸進性の体重減少、貧血、皮膚乾燥又は浮腫、食欲不振などを主症状とする全身状態の不良をいい、感染症、寄生虫症、悪性腫瘍など非常に多くの疾患の末期症状としてみられる。本明細書では、食欲亢進、摂食増加、摂食促進などの用語は同じ意味をもつ言葉として互換的に使用する。

本発明はさらに、グレリンの存在下又は非存在下に、候補物質を動物に投与し、摂食量、NPY mRNA発現量、NPYとNPYのY1受容体との結合量、酸素消費量、胃内容排出速度、又は迷走神経の活性を測定することを含む、グレリン又はグレリン類似体のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。具体的な測定方法は例えば本明細書に記載の方法を用いることができるが、これに限定されない。

上記スクリーニング方法で得られたグレリン又はグレリン類似体のアゴニストを本発明の食欲不振症又は体重減少症治療剤の有効成分として用いることができる。

また、上記スクリーニング方法で得られたグレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストを本発明の肥満予防剤又は治療剤の有効成分として用いることができる。以下の実施例に示すように、NPYのY1受容体アンタゴニストで前処理することによって、グレリンで誘導される摂食促進を有意に阻害した。従って、グレリン又はグレリン類似体のアンタゴニスト投与により、肥満を治療するだけでなく、予防することも可能となる。

本発明では、グレリン又はグレリン類似体のアゴニストとしてモチリンもしくは

はモチリン類似体又はそれらのアゴニストを用いることができ、またグレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストとしてモチリンもしくはモチリン類似体のアンタゴニストを用いることができる。

- モチリンは十二指腸、空腸上部の内分泌細胞から分泌される 22 アミノ酸残基のペプチドであり (Itoh, Z., *Peptides*, 18:593-608, 1997)、消化管の空腹期 (interdigestive) 運動、胆嚢収縮及び胃や膵臓からの酵素分泌に関与する。モチリンは GH 分泌を促進することが報告されており、非ペプチド性のモチリンアゴニストを用いて胃の運動を促進することが報告されている (前出、Itoh)。図 1 の A に示すように、ヒトグレリンとヒトモチリンは互いに 36% のアミノ酸同一性を示す (アクセス番号 A 59316 及び P 12872)。さらに、図 1 の B に示すように、ヒトグレリン受容体はヒトモチリン受容体と全体として 50% のアミノ酸同一性を示す (アクセス番号 Q 92847、Q 92848 及び Q 43193)。また、最近になって、Tomasetto たちもマウス胃から新規なペプチドを単離したが、これはグレリンと同一であり、モチリン関連ペプチドと命名した (Tomasetto C. et al., *Gastroenterology*, 119:395-405, 2000)。グレリンとモチリンとの配列相同性及びグレリン受容体とモチリン受容体との配列相同性に鑑み、グレリン又はグレリン類似体のアゴニストとしてモチリンもしくはモチリン類似体又はそれらのアゴニストを用いることができ、またグレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストとしてモチリンもしくはモチリン類似体のアンタゴニストを用いることができる。

- 摂食とエネルギーバランスを制御するメカニズムは複雑であり、まだ十分には解明されていない。現在までに、NPY、AGRP、オレキシン類、MCH、ビーコン (beacon)、メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)、ニューロメジン U、コカイン-及びアンフェタミン-制御転写物 (CART)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) やレプチンを含む多くのペプチドがエネルギー恒常性に影響することが示されてきた。上述したように、36 アミノ酸からなるペプチドである NPY が摂食刺激系及び体重制御における鍵となる成分の一つである。これまでの研究では、中枢投与した NPY はげっ歯類で摂食を刺激し、代謝率を下げ (Bray G.A. et al., *Recent Prog Horm Res*, 53:95-118, 1998)。NPY 類似体

及び特定のアンタゴニストを用いた受容体の薬理学的性状決定によると、Y1受容体及びY5受容体のいずれもがNPY摂食受容体であると考えられている。

- 本発明において、ICV投与したグレリンはNPYと同様に摂食を顕著に刺激し、酸素消費量を減少し、これらはいずれもY1受容体アンタゴニストでブロックされた。少量のグレリンが脳に存在することが逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)による増幅と、免疫組織学的分析で示唆されている。従来の報告では、GHS-Rは弓状核(arcuate nucleus: ARC)に局在しており、弓状核でNPYが合成される(Tannenbaum GS et al., *Endocrinology*, 139:4420-4423, 1998)。インサイチュハイブリダーゼーション試験で、GHS-RとNPYは弓状核ニューロンに共に局在していることが示されている(Guan XM et al., *Brain Res MolBrain Res*, 48:23-29, 1997 など)。さらに、非ペプチド性の成長ホルモン放出促進因子が視床下部で機能して弓状核ニューロンの電気活性を変えて、転写因子であるc-fosの発現を活性化することが知られている(Dickson SJ et al., *Neuroendocrinology*, 61:36-43, 1995 など)。
- 本発明では、NPYのmRNA発現はグレリンを中枢投与することによって有意に上昇した。従って、ポジティブなエネルギーバランスを生み出すグレリンの作用メカニズムは、視床下部のNPYとY1受容体系と関与していると思われる。現在までに、いくつかのペプチドが脳に投与したときに摂食を増加することが示されている(Elmqvist JK et al., *Nat Neurosci*, 1:445-450, 1998 など)。しかしながら、末梢投与して食欲亢進作用を示すペプチドは今までに報告されていない。本発明では、末梢投与したグレリンがNPYとY1受容体を介して摂食刺激することを明らかにした。迅速な胃の内容物排出は過食や肥満と密に関連すること、また同様に胃の内容物排出の遅延は食欲不振や悪液質と関連することが示唆されている(Inui A., *Cancer Res* 59:4493-4501, 1999 など)。本発明では、グレリンはモチリンと同様に有意に胃内容物排出速度を増加した。これまでの研究では、コレシストキニン(CCK)が強力な摂食阻害効果と、胃迷走神経の求心活性化を介する胃空疎化を阻害する効果を有することが報告されている(Schwartz GJ et al., *Am J Physiol*, 272:R1726-1733, 1997)。
- 本発明では、グレリンの食欲亢進効果もまた迷走神経と求心活性を介している

ことを明らかにした。電気生理学的研究から明らかのように、ラットに静脈投与するときのグレリンの有効量は、CCKの有効量よりも低い。ポンベシン、IL-1 β 、レプチン及びガストリン放出ペプチド（GRP）を含む種々の反オレキシン分子（anorexigenic molecules）が胃迷走神経求心の放電率（discharge rate）を増加することが報告されている（前出、Schwartz など）。従って、グレリンが迷走神経活性に及ぼす効果、及び摂食に及ぼす効果はこれらの摂食阻害分子とは反対のものであり、食欲亢進活性が迷走神経を介して作用することを支持している。

- さらに本発明では、胃でのグレリンmRNAの発現が飢餓状態によって上昇することを示した。これらの結果は、飢餓状態でのグレリンmRNAの増加が少なくとも部分的には視床下部NPYの活性化の原因であり、その結果摂食を引き起こすことを示唆している。もしそうであるとする、胃は、末梢から視床下部への飽満シグナルであるレプチンの産生源であるだけでなく、摂食刺激シグナルであるグレリンの産生源でもある。食欲不振や悪液質では、IL-1、IL-6や腫瘍壊死因子のようなサイトカインがエネルギーバランスに重要な影響を及ぼす（Inui A., Cancer Res 59:4493-4501, 1999 など）。また、悪液質は体重減少などを主症状とする全身状態の不良をきたすことが知られている。摂食を抑制することが知られているレプチン、CRF、CCK及びインスリンを含むいくつかのホルモンはサイトカインで誘導される。本発明では、胃でのグレリンmRNA発現がIL-1 β 及びレプチンのいずれによっても減少し、ob/obマウス（レプチンが欠失しており、そのため暴食に陥り肥満となっているマウス）では上昇することを示した。レプチンを繰り返し投与するとエネルギーの取込だけでなく、グレリンmRNAの発現も減少した。従って、胃におけるグレリン遺伝子の発現が食欲の制御と蜜に関連しており、飢餓状態への適応性応答又は肥満の発生のいずれかに役割を果たしている。さらに、末梢投与したグレリンがIL-1 β で誘導される食欲不振と体重減少を逆転させ、悪液質状態を改善した。グレリンが下垂体からの成長ホルモン放出を強力に刺激することは知られている（前出、Kojima et al.）。これらの知見と本発明で得られた知見を合わせて考えると、IP投与したグレリンのみで、体重増加を刺激することができ、このペプチドが体

の成長と脂肪組織の質量の制御に寄与している可能性がある。本発明者は特定の理論に拘束されるものではないが、グレリンは、短期的な食事関連のオレキシゲン（CCKやその他の食事関連飽満因子のカウンターパート）というよりは、体重を長期的に制御する因子、すなわちレプチンのカウンターパートであるのかも

5 知れない。現在までのところ、成長ホルモンは、外科手術ストレス、敗血症、グルココルチコイド投与、HIV感染及び癌と関連する筋肉喪失を治療する有力な同化剤として用いられてきた。成長ホルモンは少なくともある条件下では、全身と筋肉タンパク質合成を刺激する。代って、グレリンは成長ホルモン分泌が減少し、筋肉質量が減少し、また多くの場合食欲不振を伴う老人の治療に有効である。

10 グレリン又はグレリン類似体を有効成分とする本発明の低栄養症状を示す疾患の治療剤は、摂食を促進し、エネルギー消費を減少し、成長ホルモン分泌を刺激することによって、ポジティブなエネルギーバランス状態と体重増加を誘導する。

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

15

【実施例】

試験材料及び方法

(1) 動物実験

7週齢のd d y雄マウス（32-35g）はJAPAN SLC (Shizuoka, Japan)から購入した。10-11週齢の肥満型（ob/ob）C57BL/6Jマウス（38-42g）はShionogi Co., Ltd. (Shiga, Japan)から購入した。これらを個別で制御された環境で飼育した（温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12時間ごとの明暗サイクルで午前7時に明サイクル開始）。特記しない限り食餌と水は自由に与えた。マウスは各実験で1回だけ用いた。ラットグレリン、ラットN

20 PY、ヒトアゴウチ関連タンパク質（agouti-related protein）86-132（AGRP）、マウスオレキシシンA、マウスオレキシシンB及びマウスメラニン濃縮ホルモン（MCH）はPeptide Institute (Osaka, Japan)から購入した。組換えマウスレプチン及び組換えマウスIL-1 β はそれぞれR & D Systems (Minneapolis, USA)及びUpstate Biotechnology (New York, USA)から購入した。

B I B O 3 3 0 4 は Boeringer-Ingelheim Pharma, Germany) から、また L 1 5 2 8 0 4 及び J 1 1 5 8 1 4 は Banyu (Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) から恵与された。なお、B I B O 3 3 0 4 及び J 1 1 5 8 1 4 は N P Y の Y 1 受容体アンタゴニストであり、L 1 5 2 8 0 4 は Y 5 受容体アンタゴニストである。投与の直前に各薬剤を人工脳脊髄液 (A C S F) 4 μ l で希釈して第三脳室内 (intra-third cerebroventricular: I C V) 投与するか、あるいは生理食塩水 1 0 0 μ l で希釈して腹腔内 (I P) 投与した。対照群には A C S F 又は生理食塩水のみを与えた。各アンタゴニストはグレリンと同時に投与した。結果は平均値 \pm S E で示した。分散解析 (A N O V A) を行い、Bonferroni の t 検定により群間の差を求めた。P < 0. 0 5 の場合に統計的に有意な差があったとした。

(2) I C V 投与

I C V 投与を行うためには、マウスをペントバルビタールナトリウム (8 0 - 8 5 m g / k g I P) で麻酔し、実験前の 7 日間、定位固定装置 (S R - 6, Narishige, Tokyo, Japan) 内においた。各頭蓋骨に、針を使って中央縫合の側方 0. 9 m m で前頂の 0. 9 m m 後方に穴をあけた。一端を長さ 3 m m にわたって傾斜させた 2 4 ゲージのカニユーレ (Safelet-Cas, Nipro, Osaka, Japan) を第三脳室に埋め込み I C V 投与用とした。カニユーレを歯科用セメントで頭蓋骨に固定し、シリコンでふたをした。2 7 ゲージの注入用インサートを P E - 2 0 チュービングでマイクロシリッジに取り付けた。マウスを拘束したり、行動を大きく制限することなく、これをピンセットで前記の固定したカニユーレに挿入した。実験終了後、カニユーレ端の位置を確認するために、色素 (エバンスブルー 0. 5 % 及びゼラチン 5 %) を注入し、凍結脳セクションの組織学的実験に供した。

(3) 迷走神経切断術 (truncal vagotomy)

実験の 4 日前に、以下のようにして迷走神経切断術を行った。マウスをペントバルビタールナトリウム (8 0 - 8 5 m g / k g I P) で麻酔した。腹壁の中央線を切開して、胃を暖かい食塩水で湿らせた滅菌ガーゼで覆った。食道下部を露出して、迷走神経の前方枝及び後方枝を切断した。手術の最後に腹壁を二重に縫合した。シャム (虚偽) 手術マウスでは、同様に迷走神経幹を露出したが、切断はしなかった。迷走神経を切断したマウス及びシャム手術したマウスを完全栄養

流動食 (Oriental Yeast Co., Ltd. Tokyo, Japan) で飼育した。

(4) 摂食試験

試験は10時に開始した。摂食試験前に、マウスには自由に食餌と水を摂らせた。ただし、グレリンとIL-1 β のIP共投与が摂食に及ぼす効果を調べる試験では、マウスに16時間食餌を与えず、水のみ自由に摂らせた。摂食量の測定は、ICV又はIP投与の20分、1時間、2時間及び4時間後に、予め測定して与えておいた食餌量から残った食餌量を差し引いて求めた。食餌制限をしなかったリーンマウスでは、グレリン (3ナノモル/マウス)、IL-1 β (5ピコモル/マウス) もしくは生理食塩水を5日間繰り返しIP投与した。マウスには7時と19時に毎日注射した。摂食量と体重を毎日測定するとともに、毛並みの状態を観察した。

(5) RNAの単離とノーザンブロット分析

視床下部ブロックと胃からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いてRNAを単離した。全RNAをホルムアルデヒドで変性し、1%アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N⁺ メンブラン (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) にブロットした (Ueno N. et al., Gastroenterology, 117:1427-1432, 1999)。メンブランを³²P標識したcDNAプローブとハイブリダイズさせて視床下部中のNPY mRNAを測定し、ジギキシゲニン標識したcDNAプローブとハイブリダイズさせて胃中のグレリンmRNAを測定した。ハイブリダイズしたシグナルの全量をデンストメトリ (Image Master 1D Elite ver 3.0, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) で測定した。データをグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (G3PDH) mRNAに正規化して対照群のパーセントで表示した。

(6) NPY遺伝子発現

マウスを24時間絶食させた。絶食期間中、ICV投与する予定のマウスにはグレリン (1ナノモル/マウス) もしくはACSFを12時間毎に投与し、3回目の最終投与の30分後にマウスを頸部脱臼によって殺した。IP投与する予定のマウスにはグレリン (3ナノモル/マウス) もしくは生理食塩水を8時間毎に投与し、4回目の最終投与の30分後にマウスを頸部脱臼によって殺した。直ち

に脳ブロックを切除してドライアイスで凍結し、ノーザンブロットを調製するまで -80°C で保存した。

(7) グレリン遺伝子発現

- 5 リーンマウスを48時間絶食させた。絶食期間中、絶食マウスにIL-1 β (5ピコモル/マウス)、レプチン (3ナノモル/マウス) もしくは生理食塩水を12時間毎にIP投与し、5回目の最終投与の30分後にマウスを頸部脱臼によって殺した。絶食しないob/obマウスでは、レプチン (3ナノモル/マウス) もしくは生理食塩水を7日間繰り返し投与した。マウスには毎日7時と19時に注射をし、最終投与の30分後にマウスを頸部脱臼によって殺した。直ちに胃を
- 10 切除してドライアイスで凍結し、ノーザンブロットを調製するまで -80°C で保存した。

(8) 酸素消費量

- 酸素消費量を 22°C で O_2/CO_2 代謝測定システム (Model MK-5000, Muromachikikai, Tokyo, Japan) を用いて測定した (前出, Ueno N. et al.) 。
- 15 チャンバー容量は560ml、チャンバーへの空気の流速は500ml/分であった。サンプルは3分ごとに取り出し、標準ガスサンプルは30分毎に取り出した。マウスを明サイクル中で食餌、水を与えずに、またチャンバー中に拘束せずに入れて、BIBO3304 (5ナノモル/マウス) の存在下もしくは不在下に、グレリン (10時に0.3-1ナノモル/マウス) をICV投与し、その2時間
- 20 後の酸素消費量を測定した。

(9) 胃内容排出速度

- 胃内容排出速度測定試験の前に、マウスを16時間絶食させ、水は自由に摂らせた。絶食マウスに予め計量した食餌ペレットを1時間自由に摂らせ、その後グレリンを投与した。投与後1又は2時間で再度マウスを絶食させた。摂食重量は
- 25 残ったペレットを計量して求めた。試験開始後2又は3時間後にマウスを頸部脱臼により殺した。ただちに胃を開腹術により露出し、幽門と噴門を素早く結紮して除去し、乾燥内容物重量を測定した。内容物は真空凍結乾燥システム (Model 77400, Labconco, Kansas, USA) で乾燥した。胃内容排出速度は以下の式によって計算した：

胃内容排出速度 (%) = $\{1 - (\text{胃から回収した食餌の乾燥重量} / \text{摂食重量})\} \times 100$

(10) 電気生理学的研究

雄Wistarラット (300 g) をウレタン (1 g/kg IP) で麻酔し、
5 気管カニューレを挿入した。解剖顕微鏡下で、迷走神経の胃分岐部 (gastric branch) の末梢切断端から神経フィラメントを切り出して、一対の銀線電極で求心性の神経活性を記録した。神経活性の経時変化を観察するために、速度メータ (rate meter) (5 秒の休止期間) を用いた (Nijima A., J. Nutr 130:971S-973S, 2000)。グレリン (3-300 フェモトモル/ラット) 投与は下方大静脈 (IV) に挿入した小さいカテーテルを介して行った。迷走神経活性に及ぼすグレリンの効果を、注射の前後 50 秒にわたって、5 秒ごとのインパルスの平均数を比較することで測定した。結果は平均値 \pm SE で表した。ANOVA 及び Scheffe 検定を行い、群間の差を評価した。P < 0.05 の場合を統計的に有意であると判定した。

15 実施例 1: グレリン I.C.V 投与の摂食に及ぼす効果

本実施例では、グレリンのマウス脳室 (ICV) 投与の効果を試験した。絶食しないリーンマウスに ACSF (対照) 又はグレリン (0.003-1 ナノモル/マウス) を ICV 投与した。薬剤投与の 20 分、1 時間、2 時間及び 4 時間後に摂食量を試験した。得られた結果を図 2 に示す。結果は平均 \pm SE で表し、n
20 は動物数を表す。*P < 0.05 及び **P < 0.01 は、Bonferroni の t 検定によって対照群と比較した有意差である。グレリンは用量依存的に摂食量を顕著かつ有意に増加した。ICV 投与の 24 時間後では、1 ナノモルのグレリンを投与したマウスでは累積的摂食量も増加したが、これは統計的有意差ではなかった (6.31 \pm 0.10 g 対 5.68 \pm 0.21 g (対照群): P < 0.076)。

25

実施例 2: 他のペプチドと比較したグレリン ICV 投与の効果

NPY、AGRP、オレキシン A、オレキシン B 及び MCH と比較したグレリンのマウス ICV 投与の効果を実施例 1 と同様にして、1 ナノモル/マウスで試験した。結果を図 3 に示す。4 時間での摂食増加能は、NPY > グレリン > AG

RP>オレキシンA>オレキシンB>MCHの順であった。従って、グレリンはNPYを除く全ての食欲亢進性ペプチドよりも強力であった。

実施例3：グレリンICV投与のNPY遺伝子発現に及ぼす効果

- 5 グレリンがNPY経路を介して作用している可能性を試験するために、グレリンのICV投与後の視床下部におけるNPY遺伝子の発現を上記した方法により調べた。得られた結果を図4に示す。上のパネルは、グレリンICV投与後の視床下部NPY mRNAのノーザンブロットを示す。下のグラフは、ノーザンブロットのデータをグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (G3PDH)
- 10 mRNAに正規化して対照群のパーセントで表示したものである。グレリンはNPY mRNAの発現を58%も増加した。

実施例4：NPYの受容体アンタゴニストによる前処理がグレリン誘導の摂食増加に及ぼす効果

- 15 NPYのY1受容体アンタゴニスト (BIBO3304及びJ115814) 及びY5受容体アンタゴニスト (L152804) で前処理することが、グレリンで誘導された摂食に効果を及ぼすかどうかについて試験した。Y1受容体アンタゴニストであるBIBO3304及びJ115814 (5ナノモル/マウス：ICV投与) はグレリン (1ナノモル/マウス：ICV投与) で誘導される摂食
- 20 を有意に阻害した。一方、Y5受容体アンタゴニストのL152804 (5ナノモル/マウス：ICV投与) はこの効果を示さなかった (図5)。従って、グレリンはNPYのY1受容体を介して作用していると考えられた。

実施例5：グレリンのICV投与の酸素消費量に及ぼす効果

- 25 グレリンのICV投与の酸素消費量に及ぼす効果を上記の方法を用いて試験した。得られた結果を図6に示す。グレリンは摂食促進したのと同じ用量 (0.3-1ナノモル/マウス：ICV投与) で酸素消費量を減少したが、これはY1受容体アンタゴニスト (BIBO3304：5ナノモル/マウス：ICV投与) で前処理することによって阻害された。また、グレリンは、1ナノモルグレリンを

投与したマウスで、ICV投与の1時間 ($7.24 \pm 6.96\%$) 及び2時間 ($5.18 \pm 6.01\%$) 後に呼吸商 (RQ) を増加する傾向を示したが、統計的有意差には至らなかった。

5 実施例6：グレリンIP投与の摂食及びNPY mRNA発現に及ぼす効果

IP投与したグレリンが同様な摂食亢進効果を示すかを絶食していないリーンマウスで試験した。グレリンのIP投与は3ナノモル/マウスで顕著に摂食を増加した(図7)。3ナノモル/マウスのグレリンをIP投与した24時間後の蓄積摂食量はさらに有意に高かった (6.68 ± 0.16 g 対 6.10 ± 0.17 g (対照) ; $P < 0.05$)。この食欲亢進活性はY1受容体アンタゴニストであるBIBO3304のICV投与によってブロックされたが、Y5受容体アンタゴニストのL152804ではブロックされなかった。グレリンのIP投与後の視床下部NPYのmRNA発現をノーザンブロットで試験したところ、12%の発現増加が観察された(図8：なお、図8中のSalineは、対照群として食塩水を投与した群での結果を示す)。

実施例7：グレリンIP投与の胃内容物排出速度に及ぼす効果

グレリンが胃内容物排出速度を増加するかどうかを上記の方法を用いて試験した。図9は、グレリン ($0.3-1$ ナノモル/マウス) をICV投与したときの1時間及び2時間後の胃内容物排出速度を示す。ICV投与でもIP投与でも、グレリンは投与1時間後で胃内容物排出速度を有意に増加した ($30.16 \pm 3.70\%$ (3 ナノモル) 対 $20.34 \pm 2.27\%$ (対照) ; $P < 0.05$)。従って、グレリンはモチリンと同様に胃の運動を亢進する。

25 実施例8：迷走神経切断術がグレリンの摂食促進効果、NPY mRNA発現及び胃迷走神経の求心性神経活性に及ぼす効果

グレリンの摂食促進効果が迷走神経を介する経路と関連するかどうかを上述した方法で迷走神経切断術を施したマウスで試験した。迷走神経切断術は侵襲的手術であるが、この手術によってグレリンのIP投与で誘導された摂食促進効果が

無くなった（図10：なお、図10中で、Shamはシャム手術群、Vagotomyは迷走神経切断術を施した群を示す）。IP投与したグレリンで誘導された視床下部NPYのmRNA発現の有意な増加もこの手術によって無くなった（データ示さず）。上記の方法を用いて行った電気生理学的研究では、グレリンのIV投与は胃迷走神経の求心性の神経活性を有意に減少した（図11）。

実施例9：グレリンmRNAの胃での発現

グレリンmRNAの胃での発現をノーザンブロット分析で試験した。図12に示すように、48時間の絶食は、対照の絶食しないマウスに比べて有意に（16%）グレリンmRNAを増加した（なお、図12中で、Fedは絶食をしないマウス群を、Fastは絶食をしたマウス群を示す）。

胃でのグレリンmRNA発現に何らかの異化物質が影響を及ぼしているかどうかを試験するために、IL-1 β 及びレプチンをIP投与した。図13に示すように、IL-1 β とレプチンはいずれも胃におけるグレリンmRNAの発現を有意に減少した（IL-1 β については $23 \pm 2.8\%$ 、レプチンについては $22 \pm 3.5\%$ ）。

また、ob/ob肥満マウスの胃におけるノーザンブロット分析を行った。任意量の食餌をさせたリーンマウスと比較して、ob/obマウスのグレリンmRNA発現は有意に（19%）上昇していた（図14）。レプチンはob/obマウスにおいても、リーンマウスにおいても有意に（ $17 \pm 3.2\%$ ； $P < 0.01$ ）グレリンmRNAの発現を減少した。ob/obマウスにレプチンを繰り返し投与すると、食塩水を与えた対照群と比較して、グレリンmRNAを有意に（31%）減少し、また同時に摂食量と体重が減少した（図15）。対照群及びob/obマウスのどちらにおいても視床下部のノーザンブロットではグレリンmRNAの発現を検出しなかった。

実施例10：グレリンとIL-1 β を共投与したときの摂食量と体重に及ぼす効果

グレリンとIL-1 β を共投与したときの摂食量と体重に及ぼす効果を検討し

た。図 16 に示すように、IL-1 β で誘導される摂食減少はグレリンによってブロックされた。さらに、グレリンを繰り返し投与すると、IL-1 β で誘導される摂食量と体重の減少を逆転した (図 17)。

- また、IL-1 β のみを投与した群では、毛並みが乱れ、全身状態の悪化が観察されたが、グレリンと IL-1 β を共投与した群では、毛並みが改善し、グレリンが悪液質に伴う全身状態の不良を改善することがわかった。

実施例 11 : LC-6 移植 HHM/cahexia モデルマウスに対するグレリンの影響

- モデル動物として、ヒト肺癌細胞株 LC-6 を移植した HHM モデルマウスを用いた。このモデルマウスは悪液質に伴う体重減少を示すことが知られている (WO 98/13388)。1 群 6 匹のマウスにグレリンを 3、0、3、0 nmol/個体を 10 回 (1 日 2 回、12 時間おき、5 日間) 投与した。別途、腫瘍を移植していない正常群 (n = 5) を準備した。

- 0 - 5 日目に体重測定を行い、また 5 日目には精巣周辺の脂肪重量を測定した。得られた結果を図 18 及び図 19 に示す。3 nmol 投与群は、0 nmol 投与群に比較して投与開始後 3 日目まで体重の増加が認められ、5 日目まで持続した。また、3 nmol 投与群は、0 nmol 投与群に比較して脂肪重量の増加が認められた。

請求の範囲

1. グレリン又はグレリン類似体を有効成分として含有する低栄養症状を示す疾患の治療剤。
- 5 2. 低栄養症状を示す疾患が食欲不振、悪液質又は悪性疾患、感染症及び炎症性疾患による付随的体重減少による衰弱状態から選ばれる疾患である請求項1記載の治療剤。
3. 悪液質に伴う食欲不振症又は体重減少症治療剤である請求項2記載の治療剤。
4. 末梢投与用である請求項1～3のいずれかに記載の治療剤。
- 10 5. グレリンの存在下又は非存在下に、候補物質を動物に投与し、摂食量、NPY mRNA発現量、NPYとNPYのY1受容体との結合量、酸素消費量、胃内容排出速度、又は迷走神経の活性を測定することを含む、グレリン又はグレリン類似体のアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニング方法。
6. 請求項4記載の方法により得られるグレリン又はグレリン類似体のアゴニストを有効成分として含有する食欲不振症又は体重減少症治療剤。
- 15 7. 請求項4記載の方法により得られるグレリン又はグレリン類似体のアンタゴニストを有効成分として含有する肥満予防剤又は治療剤。

1

A

グレリン
モチリン
1:--GSSFLSPHQVQQRKESKKPPAKLQPR 28
1:FV-PIFTYGELQRMQE-KERNKGQ----- 22
* * * * *

B

グレリン受容体 (GHSR) 1:MMNATPSEEPGNLTADLWDASPGNDLSGDELLQLFPAPLAGVTATCVAFVWGAGNLTMLVSRFRELRTITNLYLSSMAFSDLLTFLCMLD 100
モチリン受容体 1:M--GSPWNGSDGPEGAREPPWALP--PC-DERRICSPPLGALVPVTAATVCLCPVWGVSNNVTYMLIGRYDMRTITNLYLGSMAVSDDLILLGLPDL 95
* * * * *

グレリン受容体 (GHSR) 101:VRLNQRPNNFGDILCKLQFYSESCCTYATVLTITATLSEVRYEATCPRLAKWVTKGRVKLVITVAVAFCSAGPTFVLGVGEH-----NGT- 190
モチリン受容体 96:YLLWRSRWFGPGLLCRLSLYGEGETYATLLHMITALSVERYLATCPRLRAVLYTRRRVCALTAIWAVALLSAGPFLFVGVEQDPGISVWPGLNGTA 195
* * * * *

グレリン受容体 (GHSR) 191:-----D-P-W-D-T-NEC---R-P-T-E---FA--VR-S-G-L-L-TVMWVSSITFFELPVFCLTVLSLIGRKLWRRRRGDVWGAASLDQNHQ 260
モチリン受容体 196:RIASSPILASSPPLWLSRAPPPSPPSGPETAEAAALFSRECRSPSAQLGALRWLVNTTATYFPLCLLSILYGLIGRELWSSRRPLRGPMASGRERGRQ 295
* * * * *

グレリン受容体 (GHSR) 261:TWKMLAVWVAFILCMLPHVGVLYFSKSPGSEIAQISQYCNLSVFLYLSAAINPILYNINSKKYRVAVERILLGFEPFSQKRLSTLKDESSRAWT 360
モチリン受容体 296:TVRVLLVWLAFILCMLPHVGRITVINT-EDSRW-MY-FYQYFHTVALQLFYLSASINPILYNLISKYRBAAFKLLAKRSRPGRGRHSRDTAGEVAG 392
* * * * *

グレリン受容体 (GHSR) 361:ESSINT----- 366
モチリン受容体 393:DTGGDTVGYTETSANWKTG 412
* * * * *

図2

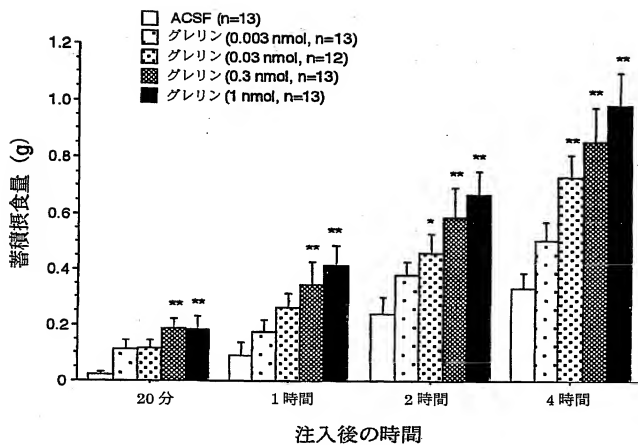


図3

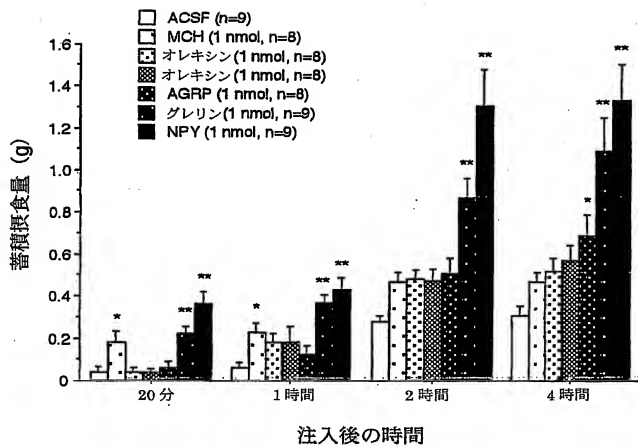


図4

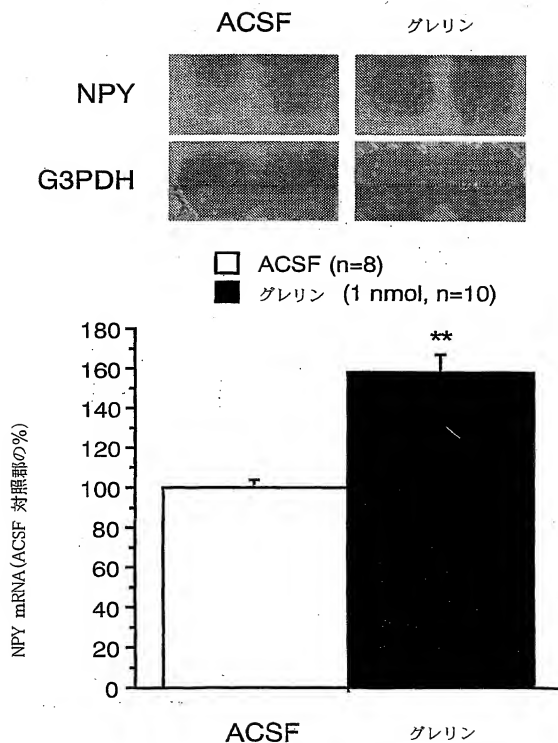


図5

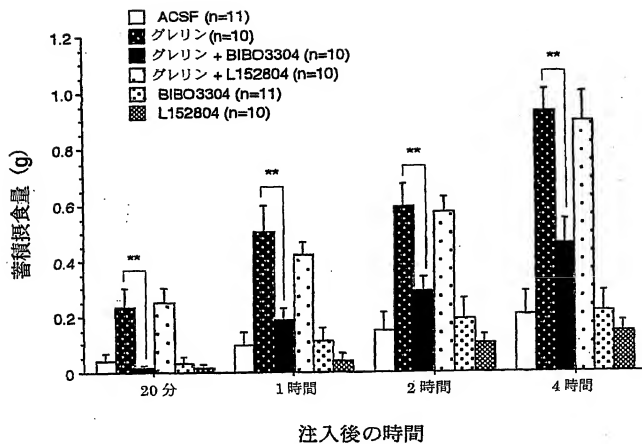


図6

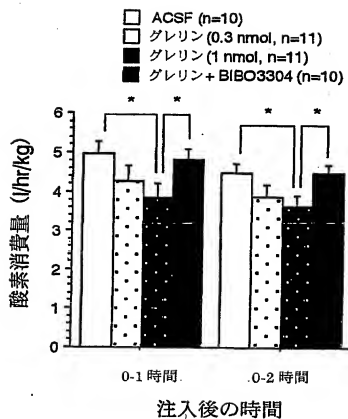


図7

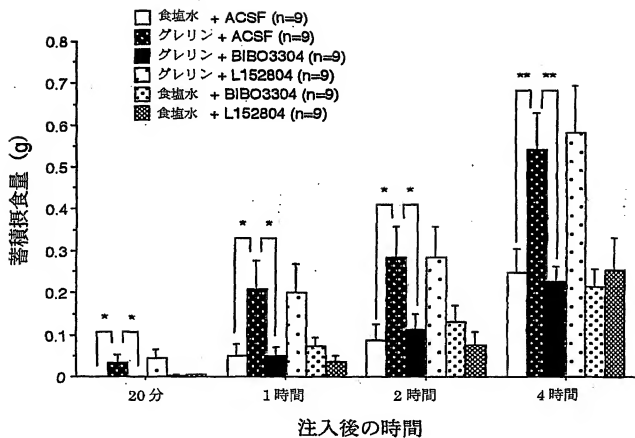


図8

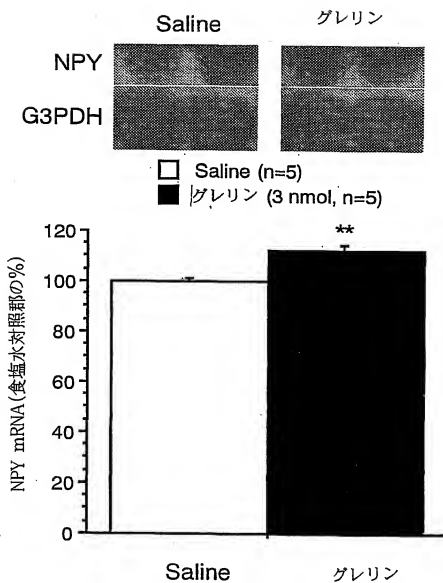


図9

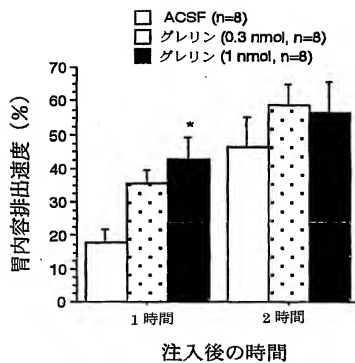


図10

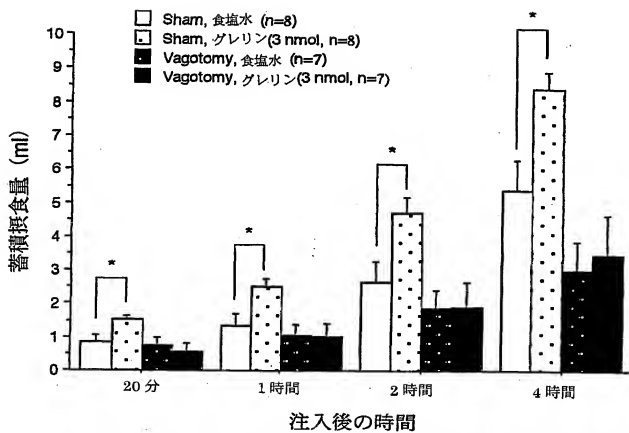
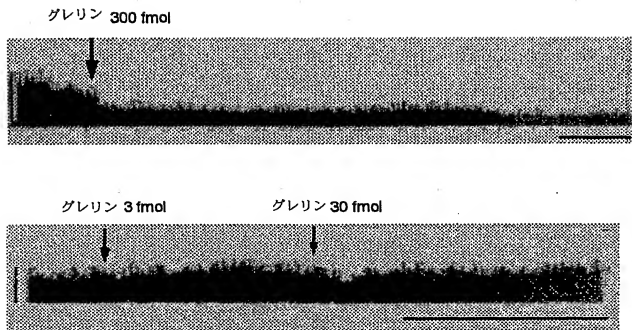


図11



縦棒 : 100 インパルス / 5 秒
横棒 : 30 分

図12

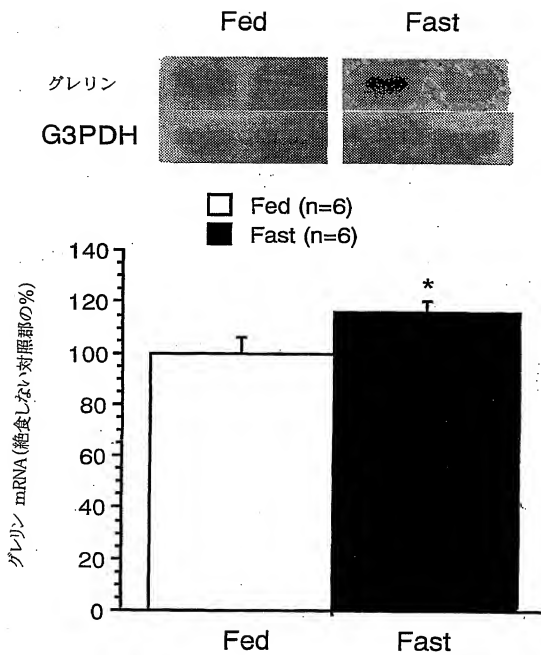


図13

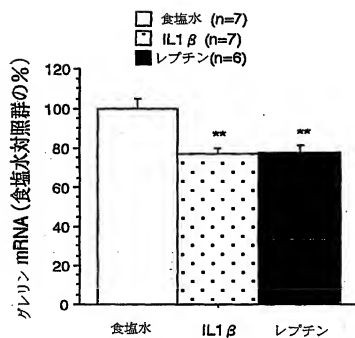


図14

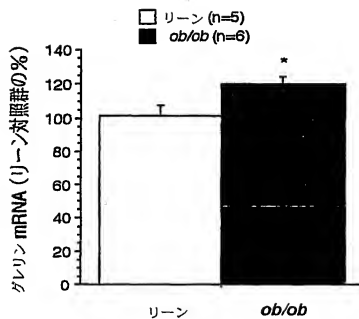


図15

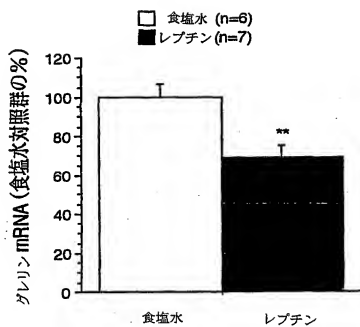


図16

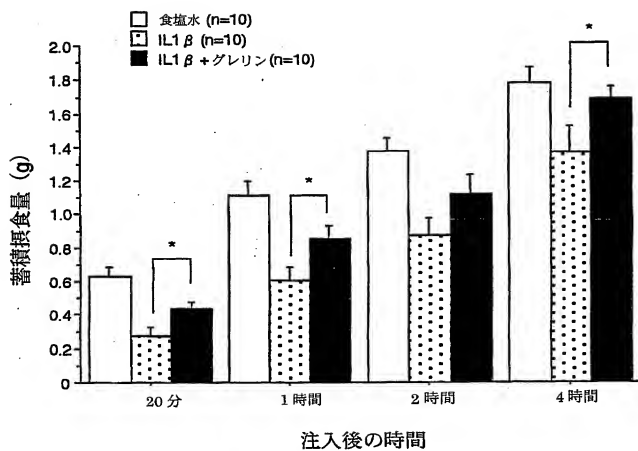


図17

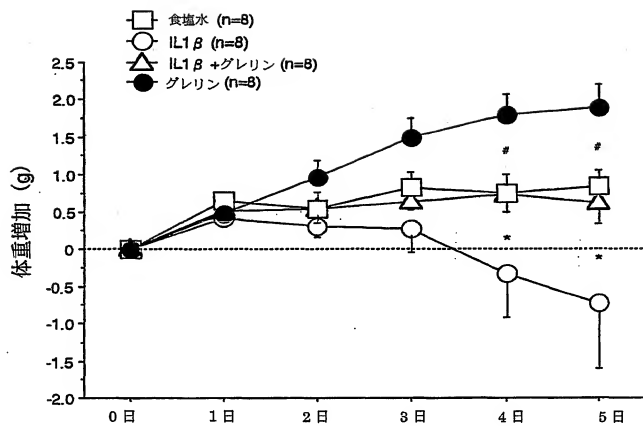


図18

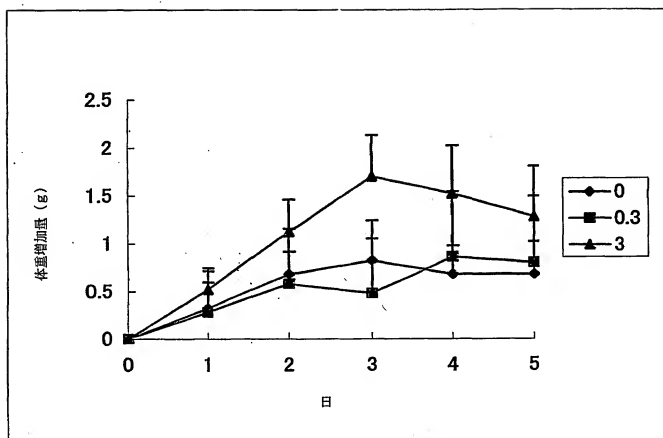
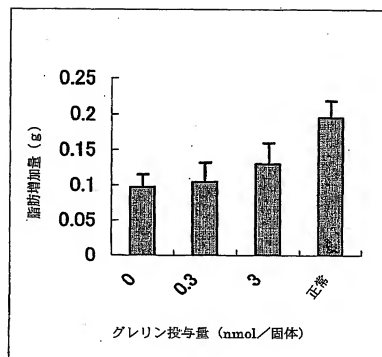


図19



Sequence Listing

<110> 中外製薬株式会社

<120> 低栄養症状疾患治療剤

<130> YCT-670

5 <160> 4

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

15 20 25

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys

1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Lys Gly Gln

25 20

<210> 3

<211> 366

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Trp Asn Ala Thr Pro Ser Glu Glu Pro Gly Phe Asn Leu Thr Leu
      1              5              10              15
5  Ala Asp Leu Asp Trp Asp Ala Ser Pro Gly Asn Asp Ser Leu Gly Asp
      20              25              30
    Glu Leu Leu Gln Leu Phe Pro Ala Pro Leu Leu Ala Gly Val Thr Ala
      35              40              45
10  Thr Cys Val Ala Leu Phe Val Val Gly Ile Ala Gly Asn Leu Leu Thr
      50              55              60
    Met Leu Val Val Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Thr Thr Thr Asn Leu
      65              70              75              80
    Tyr Leu Ser Ser Met Ala Phe Ser Asp Leu Leu Ile Phe Leu Cys Met
      85              90              95
15  Pro Leu Asp Leu Val Arg Leu Trp Gln Tyr Arg Pro Trp Asn Phe Gly
      100              105              110
    Asp Leu Leu Cys Lys Leu Phe Gln Phe Val Ser Glu Ser Cys Thr Tyr
      115              120              125
    Ala Thr Val Leu Thr Ile Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Phe Ala
20  130              135              140
    Ile Cys Phe Pro Leu Arg Ala Lys Val Val Val Thr Lys Gly Arg Val
      145              150              155              160
    Lys Leu Val Ile Phe Val Ile Trp Ala Val Ala Phe Cys Ser Ala Gly
      165              170              175
25  Pro Ile Phe Val Leu Val Gly Val Glu His Glu Asn Gly Thr Asp Pro
      180              185              190
    Trp Asp Thr Asn Glu Cys Arg Pro Thr Glu Phe Ala Val Arg Ser Gly
      195              200              205
    Leu Leu Thr Val Met Val Trp Val Ser Ser Ile Phe Phe Phe Leu Pro

```

210 215 220
 Val Phe Cys Leu Thr Val Leu Tyr Ser Leu Ile Gly Arg Lys Leu Trp
 225 230 235 240
 Arg Arg Arg Arg Gly Asp Ala Val Val Gly Ala Ser Leu Arg Asp Gln
 5 245 250 255
 Asn His Lys Gln Thr Val Lys Met Leu Ala Val Val Val Phe Ala Phe
 260 265 270
 Ile Leu Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Tyr Leu Phe Ser Lys
 275 280 285
 10 Ser Phe Glu Pro Gly Ser Leu Glu Ile Ala Gln Ile Ser Gln Tyr Cys
 290 295 300
 Asn Leu Val Ser Phe Val Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ala Ile Asn Pro
 305 310 315 320
 Ile Leu Tyr Asn Ile Met Ser Lys Lys Tyr Arg Val Ala Val Phe Arg
 15 325 330 335
 Leu Leu Gly Phe Glu Pro Phe Ser Gln Arg Lys Leu Ser Thr Leu Lys
 340 345 350
 Asp Glu Ser Ser Arg Ala Trp Thr Glu Ser Ser Ile Asn Thr
 355 360 365
 20
 <210> 4
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 4
 Met Gly Ser Pro Trp Asn Gly Ser Asp Gly Pro Glu Gly Ala Arg Glu
 1 5 10 15
 Pro Pro Trp Pro Ala Leu Pro Pro Cys Asp Glu Arg Arg Cys Ser Pro
 20 25 30

Phe Pro Leu Gly Ala Leu Val Pro Val Thr Ala Val Cys Leu Cys Leu
 35 40 45
 Phe Val Val Gly Val Ser Gly Asn Val Val Thr Val Met Leu Ile Gly
 50 55 60
 5 Arg Tyr Arg Asp Met Arg Thr Thr Thr Asn Leu Tyr Leu Gly Ser Met
 65 70 75 80
 Ala Val Ser Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Leu Pro Phe Asp Leu Tyr
 85 90 95
 Arg Leu Trp Arg Ser Arg Pro Trp Val Phe Gly Pro Leu Leu Cys Arg
 10 100 105 110
 Leu Ser Leu Tyr Val Gly Glu Gly Cys Thr Tyr Ala Thr Leu Leu His
 115 120 125
 Met Thr Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Ala Ile Cys Arg Pro Leu
 130 135 140
 15 Arg Ala Arg Val Leu Val Thr Arg Arg Arg Val Cys Ala Leu Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Leu Trp Ala Val Ala Leu Leu Ser Ala Gly Pro Phe Leu Phe Leu
 165 170 175
 Val Gly Val Glu Gln Asp Pro Gly Ile Ser Val Val Pro Gly Leu Asn
 20 180 185 190
 Gly Thr Ala Arg Ile Ala Ser Ser Pro Leu Ala Ser Ser Pro Pro Leu
 195 200 205
 Trp Leu Ser Arg Ala Pro Pro Pro Ser Pro Pro Ser Gly Pro Glu Thr
 210 215 220
 25 Ala Glu Ala Ala Ala Leu Phe Ser Arg Glu Cys Arg Pro Ser Pro Ala
 225 230 235 240
 Gln Leu Gly Ala Leu Arg Val Met Leu Trp Val Thr Thr Ala Tyr Phe
 245 250 255
 Phe Leu Pro Phe Leu Cys Leu Ser Ile Leu Tyr Gly Leu Ile Gly Arg

260 265 270
 Glu Leu Trp Ser Ser Arg Arg Pro Leu Arg Gly Pro Ala Ala Ser Gly
 275 280 285
 Arg Glu Arg Gly His Arg Gln Thr Val Arg Val Leu Leu Val Val Val
 5 290 295 300
 Leu Ala Phe Ile Ile Cys Trp Leu Pro Phe His Val Gly Arg Ile Ile
 305 310 315 320
 Tyr Ile Asn Thr Glu Asp Ser Arg Met Met Tyr Phe Tyr Gln Tyr Phe
 325 330 335
 10 Asn Ile Val Ala Leu Gln Leu Phe Tyr Leu Ser Ala Ser Ile Asn Pro
 340 345 350
 Ile Leu Tyr Asn Leu Ile Ser Lys Lys Tyr Arg Ala Ala Ala Phe Lys
 355 360 365
 Leu Leu Leu Ala Arg Lys Ser Arg Pro Arg Gly Phe His Arg Ser Arg
 15 370 375 380
 Asp Thr Ala Gly Glu Val Ala Gly Asp Thr Gly Gly Asp Thr Val Gly
 385 390 395 400
 Tyr Thr Glu Thr Ser Ala Asn Val Lys Thr Met Gly
 405 410
 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/18, 45/00, A61P1/14, 3/04, 43/00, G01N33/50, 33/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/18, 45/00, A61P1/14, 3/04, 43/00, G01N33/50, 33/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAZATO Masamitsu et al., A role for ghrelin in the central regulation of feeding, Nature, 11 January, 2001 (11.01.01), Vol.409, pages 194 to 198	1-7
X	TSCHOP Matthias et al., Ghrelin induces adiposity in rodents, Nature, (2000), Vol.407, pages 908 to 913	1-7
X	WREN A.M. et al., The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion, Endocrinology, (2000), Vol.141, No.11, pages 4325 to 4328	1-7
P, X	WO 01/56592 A1 (Novo Nordisk A/S), 09 August, 2001 (09.08.01), Full text & US 2001020012 A	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 April, 2002 (19.04.02)Date of mailing of the international search report
14 May, 2002 (14.05.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00765

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 01/87335 A2 (Eli Lilly and Co.), 22 November, 2001 (22.11.01), Full text (Family: none)	7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/18, 45/00, A61P1/14, 3/04, 43/00,
G01N33/50, 33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K38/18, 45/00, A61P1/14, 3/04, 43/00,
G01N33/50, 33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAKAZATO Masamitsu et al., A role for ghrelin in the central regulation of feeding, Nature, (2001.01.11), Vol.409, p.194-198	1-7
X	TSCHOP Matthias et al., Ghrelin induces adiposity in rodents, Nature, (2000), Vol.407, p.908-913	1-7
X	WREN A.M. et al., The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion, Endocrinology, (2000), Vol.141, No.11, p.4325-4328	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.04.02

国際調査報告の発送日

14.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4P 9638



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO 01/56592 A1 (NOVO NORDISK A/S) 2001.08.09 全文 &US 2001020012 A	1-7
PX	WO 01/87335 A2 (ELI LILLY AND COMPANY) 2001.11.22 全文 (ファミリーなし)	7